Cisbio Bioassays HYAL-ELISA, pour le dosage de l'Acide Hyaluronique

Contenu du kit

SYMBOLE	DESCRIPTION	QUANTITE
MICROPLATE	**Microplaque de 96 puits recouverts de HABP** 12 barrettes sécables de 8 puits (12 X 8 au total) sur un support avec un couvercle. Prêtes à l'emploi.	**1 plaque**
CAL A	**Calibrateur A / Diluant pour échantillon** 0 ng/ml	**1 x 1.5 ml**
CAL B	**Calibrateur B** 15 ng/ml	**1 x 0.5 ml**
CAL C	**Calibrateur C** 50 ng/ml	**1 x 0.5 ml**
CAL D	**Calibrateur D** 150 ng/ml	**1 x 0.5 ml**
CAL E	**Calibrateur E** 450 ng/ml	**1 x 0.5 ml**
CAL F	**Calibrateur F** 1000 ng/ml	**1 x 0.5 ml**
CONTROL 1	**Contrôle C1** Valeur indiquée sur l'étiquette.	**1 x 0.5 ml**
CONTROL 2	**Contrôle C2** Valeur indiquée sur l'étiquette.	**1 x 0.5 ml**
WASH	**Solution de Lavage** Concentrée 50 fois.	**1 x 30 ml**
DIL	**Diluant réactionnel pour dilution au 1:50** Prêt à l'emploi.	**1 x 50 ml**
CONJ	**Conjugué HABP-HRP** Prêt à l'emploi.	**1 x 12 ml**
SUBS TMB	**Substrat TMB** Prêt à l'emploi.	**1 x 12 ml**
STOP SOLN	**Solution d'Arrêt - HCl 1 M** Acide Chlorydrique 1M. Prêt à l'emploi.	**1 x 12 ml**
	Mode d'emploi	**1 x**

Stockage

Conserver le kit à 2 – 8°C. Ne pas congeler. Conserver les réactifs inutilisés à 2 – 8°C.

Nom et destination

Le kit Cisbio Bioassays HYAL-ELISA de dosage d'Acide Hyaluronique est un dosage sandwich sensible qui permet de doser le taux d'Acide Hyaluronique dans le plasma et le sérum.

Intérêt clinique

Acide Hyaluronique

Le Hyaluronan, connu également sous le nom d'Acide Hyaluronique (AH) ou hyaluronate est une grosse molécule linéaire de glycosaminoglycanes (GAG) non sulfatée de poids moléculaire compris entre 10^6 et 10^7 Da. C'est un des principaux composés des tissus conjonctifs et de ce fait distribué de façon ubiquitaire dans l'organisme. On trouve près de la moitié de la quantité totale d'Acide Hyaluronique dans la peau, un quart dans le squelette et les structures qui lui sont associées comme les ligaments et les articulations. L'Acide Hyaluronique est synthétisé par les fibroblastes et d'autres cellules spécialisées du tissu conjonctif.

L'Acide Hyaluronique est tout particulièrement important pour la structure et l'organisation des matrices extracellulaires. Le réseau de l'Acide Hyaluronique agit comme un tampon osmotique, est responsable de l'homéostasie de l'eau comme de la régulation de la distribution des protéines via la formation de barrières de circulation et de diffusion. De plus, l'Acide Hyaluronique interagit avec les protéines et les surfaces cellulaires et possède donc une forte influence sur les proliférations cellulaires, la différenciation et la réparation tissulaire.

Turnover et catabolisme

La demi-vie tissulaire de l'Acide Hyaluronique diffère selon les espèces et varie entre 1 et 7 jours. Une certaine quantité d'Acide Hyaluronique se dégrade localement, mais la plus grande part est éliminée et dégradée via le système lymphatique. Le reste pénètre dans la circulation sanguine d'où il sera éliminé principalement par les cellules endothéliales du foie. Une faible part est métabolisée par les reins et la rate.

Le cartilage adulte est particulier, dans la mesure où il est avasculaire et dépend du liquide synovial pour sa nutrition ainsi que pour l'élimination des déchets métaboliques. Ainsi, l'Acide Hyaluronique résultant de la dégradation du cartilage est d'abord éliminé dans le liquide synovial avant de pénétrer dans les circulations sanguine et lymphatique en passant à travers la membrane synoviale hautement vascularisée.

La demi-vie sérique de l'Acide Hyaluronique est d'environ 2 à 5 minutes. Le taux normal adulte d'Acide Hyaluronique sérique varie entre 10 et 100 µg/l et le turnover de l'Acide Hyaluronique sérique total est d'environ 10 - 100 mg/24 h. Le taux d'Acide Hyaluronique sérique est influencé par différents facteurs tels qu'âge, sexe et origine ethnique ainsi que par l'alimentation et le niveau d'activité physique. On observe une augmentation des taux sériques soit dans le cas de synthèse excessive d'Acide Hyaluronique (par ex: pathologies de la peau ou de l'articulation, cancer) ou dans le cas d'une diminution de la clairance hépatique (fibrose hépatique/cirrhose).

Les maladies héréditaires associées à des perturbations du métabolisme de l'Acide Hyaluronique (par ex: Syndrome de Werner (Pangeria) ou Acrogeria) sont rares et caractérisées par un vieillissement accéléré et prématuré. Des taux d'Acide Hyaluronique inférieurs à la normale dans les tissus, associés à un taux sérique et urinaire augmentés traduisent une augmentation du turnover de l'Acide Hyaluronique chez les personnes concernées. Certaines tumeurs comme par exemple les mésothéliomes et la tumeur de Wilms sont capables de produire soit de l'Acide Hyaluronique, soit des facteurs qui entraînent d'autres cellules à produire de l'Acide Hyaluronique et sont donc associées à de forts taux d'Acide Hyaluronique sérique. On peut observer une augmentation des taux sériques d'Acide Hyaluronique dans des processus inflammatoires comme le psoriasis ou la sclérose, ainsi que dans des conditions septiques.

Application thérapeutique

Un des premiers domaines d'application de l'Acide Hyaluronique a été la chirurgie ophtalmique dans laquelle il agit comme hydratant pour protéger le tissu sensible de l'œil et pour augmenter la cicatrisation. Des injections intra articulaires d'Acide Hyaluronique soulagent le mal aux genoux chez l'homme et les chevaux. D'autres applications thérapeutiques ciblent les tissus qui ont naturellement des taux élevés d'Acide Hyaluronique, comme la peau et le cartilage. La recherche sur les tissus utilise l'Acide Hyaluronique comme support et transporteur de médicaments dans le cadre d'implants ou de pansements afin d'augmenter la cicatrisation. En chirurgie plastique, l'Acide Hyaluronique s'utilise en injection pour combler les tissus mous.

L'Acide Hyaluronique, un outil pour le diagnostic

Atteinte Hépatique

Les raisons principales de l'atteinte chronique du foie sont l'infection virale (hépatite B ou C) et l'abus d'alcool. On observe chez les patients qui présentent une importante fibrose et cirrhose du foie une augmentation des taux sériques d'Acide Hyaluronique, la progression de la fibrose hépatique étant associée à une augmentation des taux d'Acide Hyaluronique sériques. L'acide Hyaluronique sérique peut donc être utilisé pour suivre les patients qui présentent un risque de fibrose progressive, ainsi que pour juger du succès des traitements antifibrotiques. Dans la mesure où il est corrélé avec les résultats histo-pathologiques, le dosage de l'Acide Hyaluronique pourrait diminuer la nécessité de pratiquer une biopsie hépatique. De plus, l'Acide Hyaluronique sérique est un marqueur sensible du rejet des transplantations hépatiques.

Atteinte articulaire

L'Acide Hyaluronique est l'un des principaux composants de la matrice du cartilage et du liquide synovial.
Ses propriétés viscoélastiques sont responsables du bon fonctionnement de l'articulation.

L'inflammation proliférative synoviale – qui est l'une des clefs de la polyarthrite rhumatoïde (PR) – entraîne une synthèse forcée d'Acide Hyaluronique, ce qui augmente à la fois le taux synovial et le taux sérique d'Acide Hyaluronique. Toutefois, l'inflammation articulaire peut aussi survenir lors d'autres types d'atteintes articulaires comme l'Ostéoarthrite (OA) ou un trauma. Chez les patients PR et OA, la concentration en Acide Hyaluronique est corrélée avec le degré d'inflammation de l'articulation et la prolifération synoviale ainsi qu'avec le degré de « joint space narrowing ». Les patients présentant les plus fortes concentrations initiales ont montré une progression plus importante de la maladie. On peut donc utiliser le taux d'Acide Hyaluronique sérique pour détecter une atteinte dégénérative de l'articulation, pour suivre la progression de la maladie, ainsi que pour évaluer le succès des traitements. Toutefois, une augmentation des taux d'Acide Hyaluronique peut traduire à la fois une sécrétion forcée d'Acide Hyaluronique et une dégradation progressive du cartilage. C'est pourquoi, il faut toujours comparer les taux d'Acide Hyaluronique avec des observations cliniques ou radiographiques.

Dans la mesure où l'on observe chez les patients atteints de PR une augmentation notable des taux d'Acide Hyaluronique entre 0.5 – 2 heures après s'être levés du lit, ce qui correspond à une diminution de la raideur articulaire, on pourrait obtenir des informations intéressantes en prélevant des échantillons le matin chez ces patients.

Marqueur tumoral

Dans certaines tumeurs, telles que les cancers de la prostate ou du sein, le taux d'Acide Hyaluronique semble corrélé avec la malignité. Pour certaines tumeurs, on peut donc utiliser les taux d'Acide Hyaluronique pour suivre la progression de la maladie ainsi que pour détecter les patients qui répondent à la chimiothérapie. Dans le cancer de la vessie, la synthèse de l'Acide Hyaluronique est associée à l'angiogenèse et aux métastases tumorales. De plus, une augmentation des taux urinaires d'Acide Hyaluronique indique la présence d'un cancer de la vessie, quel que soit le grade tumoral. L'analyse de l'Acide Hyaluronique urinaire – en combinaison avec celle de l'hyaluronidase – pourrait donc servir à détecter le cancer de la vessie ainsi qu'à rechercher chez les patients un cancer résiduel après résection tumorale.

Diabète

On observe des taux sériques d'Acide Hyaluronique plus élevés chez les diabétiques. Ces taux sont corrélés avec les taux de glucose plasmatique à jeun, la CRP ainsi que l'Indice de Masse Corporelle (IMC). Des complications liées au diabète, comme la rétinopathie et la néphropathie, sont associées à des taux sériques élevés d'Acide Hyaluronique. Le taux d'Acide Hyaluronique est également corrélé avec l'apparition de l'angiopathie diabétique (Cf. bibliographie[6]). Chez les patients diabétiques obèses, on a observé une augmentation de la sécrétion d'Acide Hyaluronique dans les cellules graisseuses hypertrophiques, entraînant une inflammation chronique du tissu adipeux (Cf. bibliographie [7]).

Autres applications

On a aussi dosé les concentrations d'Acide Hyaluronique dans différents types d'échantillons tels que les liquides de perfusion et les liquides de lavage brocho-alvéolaires de patients atteints d'inflammations pulmonaires, comme le poumon du fermier, la sarcoïdose ou le syndrome de détresse respiratoire.

Principe du dosage

Le kit Cisbio Bioassays de dosage de l'Acide Hyaluronique est un dosage sandwich sensible qui utilise d'une part des microplaques recouvertes par la protéine de liaison de l'Acide Hyaluronique (HABP) et d'autre part la protéine de liaison HABP conjuguée à HRP pour la détection. La protéine de liaison HABP conjuguée à HRP se lie à l'Acide Hyaluronique immobilisé, puis réagit avec le substrat. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de AH contenu dans les échantillons.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes pouvant distribuer 10-1000 µl
- Multipipettes pouvant distribuer 50 et 100 µl
- Récipients gradués pour reconstituer ou diluer les réactifs
- Système d'aspiration manuelle ou Laveur automatique de plaques ELISA
- Eau distillée
- Vortex
- Lecteur de microplaques ELISA 96 puits, capable de mesurer à 450 nm (Référence: 590–650 nm).
- Agitateur de plaques ELISA (500 tr/min) (agitation orbitale)
- Logiciel de traitement des données

Précautions d'Emploi

Ce kit est destiné exclusivement à un usage in vitro.

Suivre avec attention le Mode d'Emploi.

Les réactifs sont stables jusqu'aux dates de péremption mentionnées sur les étiquettes, sous réserve des conditions de stockage. Suivre les recommandations pour le stockage des réactifs reconstitués. Se reporter à la Fiche de Données de Sécurité pour plus de détails concernant les précautions d'utilisation.

Le matériel d'origine animale utilisé dans ce kit provient d'animaux certifiés sains : on doit toutefois le manipuler comme s'il était potentiellement infectieux. Le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation de certains réactifs a été testé et trouvé négatif pour HIV-1 et HIV-2 ainsi que pour les anticorps HCV et l'HbsAg. On doit néanmoins le manipuler comme s'il était potentiellement infectieux. Cisbio Bioassays ne peut être tenu pour responsable en cas de perte ou de problème faisant suite à un non-respect du protocole.

1 Pour utilisation in vitro.

2 Traiter tous les échantillons à tester comme potentiellement infectieux. Appliquer les précautions requises et les bonnes pratiques de laboratoire lors de la manipulation du kit et des échantillons de patients.

3 Eliminer les réactifs en respectant la législation en vigueur.

4 Utiliser ensemble les réactifs du kit avant la date de péremption qui figure sur l'étiquette externe.

5 Conserver les réactifs comme indiqué dans le mode d'emploi.

6 Ne pas utiliser les barrettes de puits recouverts si le sachet est détérioré.

7 Tester chaque échantillon en double.

8 L'utilisation de multipipettes ou de distributeur automatique est recommandée afin d'assurer une bonne distribution des réactifs.

9 a. L'acide chlorhydrique 1 M peut causer des brûlures sévères à la peau, aux yeux et aux muqueuses.

b. Manipuler le TMB avec précautions. Ne pas ingérer. Eviter tout contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.

10 On utilise un conservateur qui ne contient pas de mercure. Eviter tout contact des solutions tampons avec la peau, les yeux ou la bouche. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.

Préparation des réactifs

Microplaque recouverte de HABP

12 barrettes sécables de 8 puits (96 au total), sur un support, dans un sachet d'aluminium scellé. Fixer fermement les barrettes dans le support. Après ouverture, conserver les barrettes non utilisées dans le sachet d'origine en aluminium et fermer celui-ci.

Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration

1 Couvercle pour microplaque

Calibrateurs A à F

6 flacons de calibrateur contenant de l'Acide Hyaluronique natif (0, 15, 50, 150, 450 et 1000 ng/ml)
Le calibrateur A (0 ng/ml) sert de diluant pour les échantillons élevés.

Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration

Contrôle 1

1 flacon de contrôle bas. Valeur indiquée sur l'étiquette. Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration

Contrôle 2

1 flacon de contrôle élevé. Valeur indiquée sur l'étiquette. Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration

Solution de Lavage concentrée (50x)

1 flacon de 30 ml de Solution de Lavage concentrée. Diluer au 1:50 en complétant à 1500 ml avec de l'eau distillée.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 2 – 8°C.

Conserver sous forme non diluée à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration.

Diluant réactionnel

1 flacon de 50 ml, Prêt à l'emploi.

Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration.

Conjugué HABP-HRP

1 flacon de 12 ml, prêt à l'emploi.

Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration.

Substrat TMB

1 flacon de 12 ml de H_2O_2 et de 3,3',5,5'- Tétraméthylbenzidine stabilisée. Prêt à l'emploi.

Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration.

Solution d'Arrêt – HCl 1 M

1 flacon de 12 ml d'acide chlorhydrique 1 M. Prêt à l'emploi.

Conserver à 2 – 8°C jusqu'à la date d'expiration.

Préparation et Stabilité des Echantillons

Remarque

Prélèvements à jeun.

Centrifuger dans les 4 heures qui suivent le prélèvement de l'échantillon.

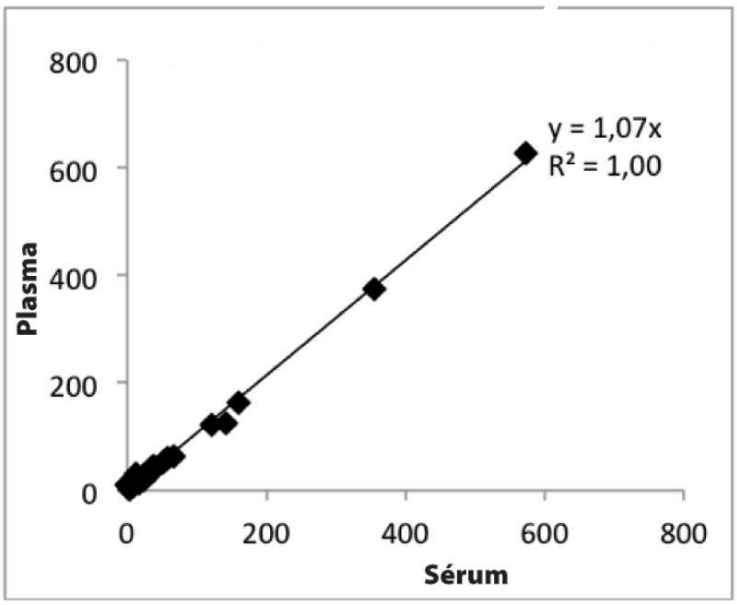
Echantillon

Les taux d'Acide Hyaluronique dépendent de l'âge, du sexe et sont influencés par l'alimentation et l'activité physique. Le dosage est valide pour le sérum et le plasma EDTA.

Sérum – Plasma EDTA

Une analyse de régression effectuée sur des échantillons de plasmas et de sérums provenant de mêmes malades a donné les résultats suivants:

Concentration plasmatique = 1.07X. Concentration sérique avec une corrélation $r^2 = 1.00$ (n = 29).



Préparation des échantillons

Les Calibrateurs, Contrôles et échantillons doivent être dilués au 1:50 à l'aide du Diluant réactionnel avant de les pipeter dans les puits de la microplaque.
(par ex: 10 µl d'échantillon+ 490 µl de Diluant réactionnel).

- **Remarque**

Normalement, 100 µl d'échantillon, dilué au 1:50, suffisent par puits.

- **Dilution**

Les patients atteints de pathologies hépatiques sévères peuvent avoir des taux de AH supérieurs à 1000 ng/ml.
Dans ce cas, avant la dilution habituelle de 1:50 à l'aide du Diluant réactionnel ,
il faudra au préalable diluer les échantillons au 1:5 par exemple, à l'aide du Calibrateur A / Diluant pour échantillon (0 ng/ml).

- **Stabilité**

- Maximum 3 jours à 2 – 8 °C
- Maximum 6 mois à -20°C
- Conservation plus longue à - 80°C
- Maximum 3 cycles de congélation/décongélation

Dosage

Tous les dosages (Calibrateurs, Contrôles et échantillons) doivent être faits en doublets. On doit les pipeter aussi rapidement que possible (<15 minutes).

Afin d'éviter les dérives dues à des différences de temps d'incubation, le Conjugué HABP-HRP, la Solution de Substrat et la Solution d'Arrêt doivent être ajoutés dans les puits de la microplaque dans le même ordre et avec le même intervalle de temps que les échantillons. Il est indispensable d'utiliser une multipipette.

Laisser tous les réactifs à température ambiante (20 – 25°C) pendant un minimum de 30 minutes.

Pendant l'incubation du conjugué et du TMB, couvrir la microplaque avec une feuille adhésive ou un couvercle. Pour les étapes sensibles à la lumière ajouter une feuille d'aluminium, ou incuber dans une chambre noire, pour éviter l'exposition à la lumière.

1 Préparer le support et le nombre nécessaire de barrettes de puits.
Pré-diluer si besoin les échantillons avec des concentrations de HA suspectées > à 1000 ng/ml avec le calibrateur A (0 ng/ml).

2 Diluer au 1 :50 les calibrateurs, Contrôles et échantillons à l'aide du diluant réactionnel

3 Pipeter 100 µl de chaque Calibrateur (A à F), Contrôles (C1 et C2) et échantillons dilués dans les puits correspondants.

4 Couvrir les puits à l'aide du couvercle, et incuber 2 heures ± 5 minutes à température ambiante (20 – 25°C), sur un agitateur de plaques (500 tr/min)

5 Après incubation, aspirer le contenu des puits à l'aide d'un laveur, ou décanter manuellement la plaque, et laver les puits à **3 reprises** avec 350 µl de Solution de Lavage diluée. Il est préférable d'utiliser un laveur automatique. Après le dernier lavage, décanter les puits sur du papier absorbant.

6 Pipeter 100 µl de Conjugué HABP-HRP dans chaque puits immédiatement après le lavage (Multipette)

7 Couvrir les puits à l'aide du couvercle, et incuber 30 ± 5 minutes à température ambiante (20 – 25°C), sur un agitateur de plaques (500 tr/min)

8 Après incubation, aspirer le contenu des puits à l'aide d'un laveur, ou décanter manuellement la plaque, et laver les puits à **5 reprises** avec 350 µl de Solution de Lavage diluée. Il est préférable d'utiliser un laveur automatique. Après le dernier lavage, décanter les puits sur du papier absorbant.

9 Pipeter 100 µl de Substrat TMB dans chaque puits immédiatement après le lavage (Multipette)

10 Incuber 30 minutes à température ambiante (20 – 25°C), à l'abri de la lumière, sur un agitateur de plaques (500 tr/min)

11 Ajouter 100 µl de Solution d'Arrêt (Multipette).

12 Lire l'absorption des puits à 450 nm dans les 10 minutes (Filtre de référence à 590 - 620 nm).
Si la DO obtenue pour le calibrateur F est supérieure à 3.0, on peut faire une nouvelle lecture à 405 nm.

Analyse des résultats

Courbe de Calibration

La courbe de calibration est établie en reportant les concentrations des calibrateurs sur l'axe des x (échelle linéaire) et les absorptions correspondantes sur l'axe des y (échelle linéaire). Les concentrations d'Acide Hyaluronique de chaque sérum dilué de patient seront lues à partir de la courbe calibrateur.

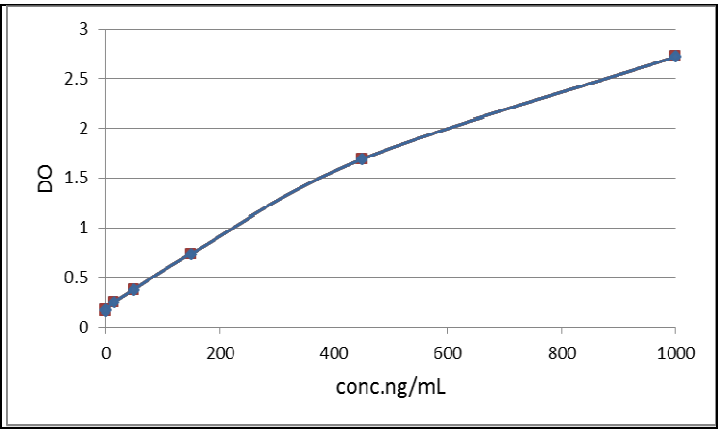
On utilisera une méthode de calcul à 4 paramètres logistique pour calculer automatiquement les résultats. Si les sérums ont été pré-dilués, on obtiendra leur concentration finale en multipliant la valeur lue sur la courbe de calibration par le facteur de dilution.

Les échantillons dont les valeurs d'absorption sont supérieures à celles du Calibrateur F devront être re-testés après avoir été dilués à l'aide du Calibrateur A et cette dilution devra être prise en compte pour le calcul de la concentration.

Exemple de résultats

(Ceci n'est qu'un exemple, ne pas l'utiliser dans le calcul des résultats.)

Echantillon	Concentration ng/ml	DO
CAL A	0	0,17
CAL B	15	0,25
CAL C	50	0,38
CAL D	150	0,74
CAL E	450	1,69
CAL F	1000	2,72



Pour chaque dosage, les résultats obtenus pour les contrôles doivent se situer dans la fourchette de valeurs indiquée sur l'étiquette de chaque contrôle. Si les valeurs des contrôles ne se situent pas dans la fourchette indiquée, les résultats doivent être considérés comme douteux et le dosage des échantillons doit être refait.

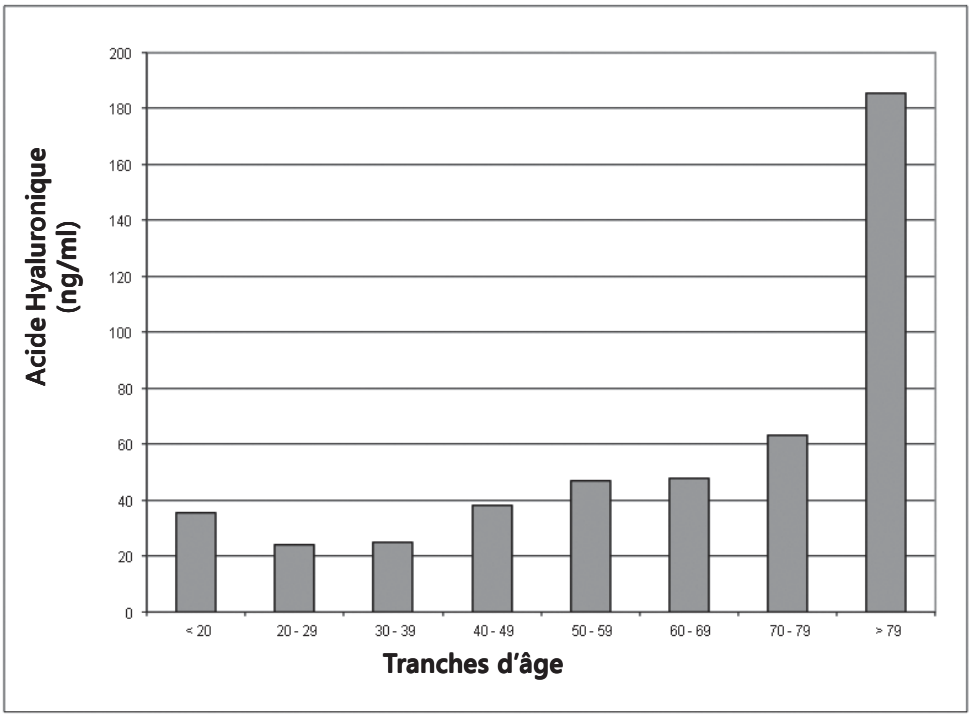
Valeurs normales

Le dosage d'acide hyaluronique a été réalisé dans les sérums de 53 individus présumés normaux (16 à 79 ans, moyenne 45,5 ans). La concentration moyenne en HA obtenue est égale à 36,7 ± 23,5 ng/ml.
Le cut-off défini comme la moyenne ± 2DS été estimé à 90 ng/ml.

		Moyenne (ng/ml)	DS (ng/ml)
Femme	Pré-ménopausée	20,1	14,3
Femme	Post-ménopausée	50,3	19,9
Homme		42,6	24,6

Influence de l'âge

Age	Moyenne (ng/ml)	DS (ng/ml)	Moyenne +2*DS (ng/ml)	N
< 20	36	22,9	81,3	4
20 - 29	24	19,7	63,2	14
30 - 39	25	18,0	60,9	8
40 - 49	38	31,9	102,1	6
50 - 59	47	23,1	93,0	5
60 - 69	48	20,3	88,6	10
70 - 79	63	44,8	152,6	9
> 79	185	14,7	214,7	2



Performances du test

Imprécision

Précision Inter-essai

	N	Moyenne (ng/ml)	DS (ng/ml)	CV (%)
Echantillon 1	3	97	6,3	6,5
Echantillon 2	3	134	7,1	5,2
Echantillon 3	3	294	15,7	5,3
Echantillon 4	3	592	28,1	4,7

Précision Intra-essais

	N	Moyenne (ng/ml)	DS (ng/ml)	CV (%)
Echantillon 1	63	96	2,8	2,9
Echantillon 2	63	133	3,7	2,8
Echantillon 3	63	291	8,4	2,9
Echantillon 4	63	589	16,8	2,8

Limite de détection

La sensibilité analytique est égale à 2,7 ng/ml (3 x DS du Calibrateur A (0 ng/ml)). Elle a été obtenue à partir de 20 essais consécutifs indépendants ou les calibrateurs ont été testés en doublet.

Dilution des échantillons

Le pourcentage de récupération moyen calculé pour des échantillons de sérums humains de taux de AH moyens ou élevés, dilués en série est égal à 107%.

Echantillon	Dilution	Mesuré (ng/ml)	Attendu (ng/ml)	Récupération (%)
5	1	183	-	-
	2	93	91	101
	4	49	46	108
	8	24	23	107
6	1	258	-	-
	2	133	129	103
	4	67	64	103
	8	33	32	103
7	1	515	-	-
	2	268	258	104
	4	149	129	116
	8	82	64	128
8	1	214	-	-
	2	109	107	102
	4	57	54	107
	8	27	27	102

Récupération

Le pourcentage de récupération moyen après ajout de différentes concentrations de AH dans différents sérums humains est égal à 97%.

Echantillon	Concentration (ng/ml)	Ajouté (ng/ml)	Mesuré (ng/ml)	Attendu (ng/ml)	Récupération (%)
9	122	82	188	204	92
		166	286	288	99
		335	433	457	95
10	92	82	160	175	91
		166	236	258	91
		335	422	428	99
11	50	82	138	132	104
		166	224	216	104
		335	393	385	102
12	27	82	95	110	87
		166	216	193	112
		335	328	362	90

Interférences

Aucune interférence de l'hémolyse de la bilirubine (450 mg/l), des lipides (30 g/l), de l'héparine (10 000 UI/ml), de l'EDTA (150 mM) ou du citrate (100 mM) n'a été observée.

Remarques

Les données qui figurent dans la notice d'utilisation ne sont données qu'à titre informatif. Il est recommandé à chaque laboratoire d'inclure ses propres contrôles dans le dosage. Afin de se conformer aux bonnes pratiques de laboratoire, chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs normales et pathologiques.

Schéma opératoire

- Amener les échantillons et les réactifs à température ambiante. Bien mélanger les échantillons
- Solution de lavage: Diluer au 1:50 avec de l'eau distillée
- Diluer les échantillons forts avec le **CAL A**
- Diluer les Calibrateurs, Contrôles et échantillons au 1 :50 à l'aide du Diluant réactionnel **DIL**

PUITS	**Calibrateurs Contrôle et Echantillons µl**	Couvrir et incuber 2 heures à 20-25°C Sous agitation 500 rpm ---------- Aspirer et laver **3 fois** avec 350 µl WASH -------- Aspirer et décanter les puits sur du papier absorbant	**Conjugué HRP µl**	Couvrir et incuber 30 mn à 20-25°C Sous agitation 500 rpm -------- Aspirer et Laver **5 fois** Avec 350 µl WASH -------- Aspirer et décanter les puits sur du papier absorbant	**Substrat TMB µl**	Couvrir et incuber 30 mn à 20-25°C Sous agitation 500 rpm A l'abri de la lumière	**Solution arrêt µl**	Mesurer la DO à 450 nm dans les 10 mn
Calibrateurs A-F	100		100		100		100	
Contrôles C1-C2	100		100		100		100	
Echantillons	100		100		100		100	